NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 112

ALDO GIGLIOTTI

STUDIO COMPARATIVO DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELL'ALCOLE METILICO DEI VINI

NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 112

ALDO GIGLIOTTI

STUDIO COMPARATIVO DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELL'ALCOLE METILICO DEI VINI

STUDIO ESEGUITO CON I CONTRIBUTI FINANZIARI DELLA
REGIONE FRIULI-VENEZIA GIULIA

Arti Grafiche Friulane - Udine - 1969

STUDIO COMPARATIVO DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELL'ALCOLE METILICO DEI VINI

Come è stato messo in luce nei nostri precedenti lavori (1) non si può non notare a tutt'oggi, da parte di chiunque sia interessato all'argomento, la palese incoerenza tra la categoricità dei limiti imposti dal D.P.R. 12 Febbraio 1965 per il contenuto in alcole metilico nei vini, e l'inadeguatezza del metodo ufficiale, con cui questo componente deve essere rivelato.

Scopo di questo lavoro è di comparare il metodo ufficiale italiano (2) con altri metodi di determinazione del metanolo più precisi, e cioè con l'acido cromotropico, la cui metodica è stata elaborata ed esposta in una nostra anteriore pubblicazione (3), ed il metodo francese di Tavernier e Jacquin (4).

Come era stato precedentemente messo in luce, il punto debole del metodo ufficialmente adottato è il tempo di ossidazione di 2', che non garantisce l'indipendenza della reazione:

$$5\ CH_3OH + 2\,KMnO_4 + 3\,H_2SO_4 \longrightarrow 5\ HCOH + 2\ MnSO_4 + K_2SO_4 + 8\ H_2O$$

dal rapporto $\frac{\text{metanolo}}{\text{etanolo}}$. Si è rilevato infatti (1) che il rendimento % $\left(\frac{\text{quantità effettiva di HCOH}}{\text{quantità teorica di HCOH}} \times 100\right)$ è maggiore per i valori più bassi del rapporto $\frac{\text{metanolo}}{\text{etanolo}}$ in soluzione. Inoltre la reazione di ossidazione dell'alcole metilico, in ambiente acido per acido solforico, non è la migliore sotto il profilo del rendimento e soprattutto la durata della ossidazione (due minuti primi) è esigua, se comparata al tempo di scolamento e di miscelazione dei 5 ml di $KMnO_4$ 1% con la solu-

zione di metanolo (intorno a 15″ con una normale pipetta). Anche se si può obbiettare che il tempo può essere reso uguale per tutte le prove, in pratica la standardizzazione di questo periodo di scolamento e miscelazione è difficilmente attuabile e incide notevolmente sulla quantità di CH_3OH ossidato e in definitiva sulla precisione dei risultati. E' singolare infatti e poco comprensibile come sia stato adottato ufficialmente un tempo di ossidazione di 2′ quando già il metodo di Bertrand e Silberstein (5), che risale al 1949, impiega un tempo di 5′, mentre Tavernier e Jacquin (4) e Bouzigues (6) adottano 20′ e il Mathers (7) infine, 30′ di ossidazione in ambiente acido per acido fosforico.

Il volume complessivo dei reagenti (soluzione ossidante più quella contenente CH_3OH), le quantità di $KMnO_4$ aggiunte ed i mg di $KMnO_4$ per ml di soluzione nei tre metodi comparati nel nostro lavoro, sono riportati nello schema seguente:

Schema 1	ml di soluzione complessivi	mg $KMnO_4$	mg di $KMnO_4$ per ml di soluzione
Metodo ufficiale	7	50	7.14
Metodo acido cromotropico	1,2	6	5
Metodo Tavernier-Jacquin	2,4	24	10

Il più basso rapporto $KMnO_4$/ml del metodo all'acido cromotropico trova la sua giustificazione nel fatto che, essendo l'acido 1,8 -diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico circa 10 volte più sensibile della Fucsina, si è cercato di attenuare la colorazione rosso-violetta finale onde spingere la validità del metodo fino ai 100 μg di CH_3OH per ml. Il metodo di Yamamura (8), che adotta un rapporto di 8.33 mg di $KMnO_4$ per ml, non riesce a mantenere la linearità della funzione densità ottica - concentrazione in CH_3OH oltre i 40 μg/ml. E' evidente che in base alla quantità di metanolo presente e al volume di liquido reagente, gli ultimi due metodi dello schema sopra riportato lavorano in scala semi-micro.

Nel corso di una lunga esperienza preparatoria di determinazione del metanolo nei vini con i metodi cui si è accennato, si aveva avuto modo di notare una decisa concordanza tra il metodo di Tavernier e Jacquin ed il metodo acido cromotropico, mentre non di rado ci capitava di ottenere dati fortemente discordanti con il metodo ufficiale.

Quello che soprattutto ci ha colpito in quest'ultimo procedimento non è stato tanto il fenomeno di invecchiamento del reattivo e la mancata rispondenza alla legge di Lambert e Beer, fatto questo comune al metodo Tavernier e Jacquin, quanto l'irregolare dislocazione dei punti nel grafico densità ottica - ml di CH_3OH/100 ml di C_2H_5OH nella curva dei campioni standard.

Il fenomeno era tanto più evidente quanto più alti erano i valori del metanolo, ma anche per bassi valori si è riscontrato che successive determinazioni del CH_3OH manifestavano nelle ripetizioni una notevole variazione. Per citare un esempio un vino contenente 106 mg/L di CH_3OH determinati con il metodo dell'acido cromotropico e 107 mg/L con il metodo Tavernier, dava nelle cinque ripetizioni, ottenute applicando il procedimento ufficiale, i seguenti dati: 88, 162, 122, 127, 127 mg/L. Il metodo ufficiale con un tempo di ossidazione di 4', ha manifestato una regolarità superiore rispetto ai 2', pur mantenendone i difetti fondamentali.

In un nostro precedente lavoro (1) si è infatti adottato il metodo ufficiale con tempo di ossidazione di 4' per la determinazione dell'alcole metilico nei vini della vendemmia 1965 ed i singoli dati erano stati ripetuti più volte e, ciò che più importa, controllati con il metodo acido cromotropico e Tavernier.

Per avere un'idea della scarsa precisione del metodo ufficiale in confronto agli altri metodi, si riporta nello schema 2 una serie di 10 ripetizioni effettuate su campioni diversi (onde non influenzare i risultati):

Schema 2	Acido cromotropico	Tavernier-Jacquin	Metodo Ufficiale t=2'	Metodo Ufficiale t=4'
1	89	93	241	167
2	86	90	275	148
3	89	98	253	151
4	87	98	249	146
5	90	98	226	149
6	88	93	245	146
7	90	95	223	151
8	91	95	249	146
9	91	87	172	148
10	83	101	172	151
Media	88.4	94.8	230.5	150.3
Deviazione standard	± 2.503	± 4.211	± 34.013	± 6.219
Errore standard	± 0.79	± 1.33	± 10.76	± 1.97

Risulta chiaro dall'esame delle deviazioni standard che la precisione del metodo ufficiale, con tempo di ossidazione di 2', è assai limitata. Per la variante con il tempo di ossidazione di 4', l'errore medio delle singole misure è notevolmente minore. Non bisogna dimenticare però che il numero di ripetizioni è limitato e non può mettere in luce tutti i difetti del metodo, come si vedrà in seguito. Appare logico infatti che, pur prestandosi ad una esecuzione dei tempi di ossidazione più esatta che non l'originale, la variante del metodo ufficiale dipende ancora in notevole misura dalla diligenza dell'operatore.

CAMPIONAMENTO E METODI

Per stabilire la validità del metodo di determinazione del metanolo con l'acido cromotropico (3), oltre che di una lunga esperienza preparatoria, ci si è serviti del campionamento dei vini provenienti dalla vendemmia 1966 in Friuli, complessivamente 124 campioni. Le zone in cui è stato effettuato il prelevamento, sono le medesime di quelle prese in esame nel precedente lavoro sulla vendemmia del 1965 (1).

Per ogni campione si è determinato il contenuto in alcole metilico con il metodo all'acido cromotropico, con quello di Tavernier-Jacquin e con quello ufficiale, che di seguito riassumiamo.

Metodo di determinazione dell'alcole metilico nei vini con acido 1,8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico.

— Si distilla una quantità di vino tale da contenere 5 ml di C_2H_5OH.
— Si raccoglie il 75-80% del volume da distillare in pallone da 200 ml.
— A 1 ml del distillato in provetta a chiusura ermetica, si aggiungono 0.2 ml di $KMnO_4$ al 3% in soluzione IN di acido fosforico.
— Si mantiene la provetta in termostato a 20° C esatti per 20', agitando di tanto in tanto.
— Allo scadere dei 20' si aggiungono 0.2 ml di Na_2SO_3 all'8%, si agita e si tappa nuovamente. Si lascia riposare per 5' e si introduce quindi la provetta in bagno di ghiaccio.
— Si aggiungono goccia a goccia 3 ml di acido cromotropico allo 0.05% in acido solforico al 75% in peso, tenuto a 0° C.
— Si tappa nuovamente, si porta la provetta in bagno bollente per 30', si raffredda e si legge allo spettrofotometro a 570 mμ dopo due ore.

Metodo di determinazione dell'alcole metilico secondo Tavernier e Jacquin (4).

— Si distilla una quantità tale di vino da contenere 2.5 ml di alcole etilico e si raccolgono i 4/5 del volume in pallone da 100 ml.
— A 1 ml di distillato in tubo da saggio a tappo smerigliato posto in bagno termostatico a 35° C, si aggiungono di seguito 0.6 ml di H_3PO_4 N e 0.8 ml di $KMnO_4$ al 3%. Si agita e si lascia per 20' in termostato.
— Si aggiungono 0.5 ml di acido ossalico al 10%, si agita e si lascia a contatto per 10'.

— Si addiziona 0.3 ml di H_2SO_4 al 20% in volume, si agita e si lascia riposare per 5', mentre la soluzione diventa limpida.
— Si aggiunge infine 1 o 1,2 ml di reattivo di Schiff, si agita e dopo 1 ora e ½ o 2 ore di permanenza in termostato, si legge all'elettrofotometro a filtro verde.

Reattivo di Schiff (*secondo Tavernier e Jacquin*):

Si sciolgono 500 mg di Fucsina pura in 300 ml ca. di H_2O bollente. A parte si porta in soluzione 5 g di Na_2SO_3 anidro in 50 ml di H_2O. Si versa questa soluzione di solfito nel pallone da 500 ml contenente la Fucsina, portata a temperatura ambiente; si aggiunge 50 ml di HCl 1N ca. e si porta a volume. Il reattivo di colore giallo pallido va conservato per 2-3 giorni all'oscuro prima di essere usato e può durare un mese e più.

Metodo ufficiale italiano di determinazione dell'alcole metilico nei vini.

— Si distilla una quantità di vino corrispondente a ml 9 di C_2H_5OH.
— Dal distillato raccolto in pallone da 100 ml, si preleva un ml e si introduce in cilindro graduato (con tappo a smeriglio).
— Si aggiunge di seguito 1 ml di H_2SO_4 (1:4), 5 ml di $KMnO_4$ 1% e si agita.
— Dopo *2 minuti* si addiziona 1 ml di acido ossalico 8% e si agita nuovamente.
— Si aggiunge ancora 1 ml di H_2SO_4 (1:4) e quando la soluzione è incolora, 5 ml del reattivo di Schiff e si agita ancora.
— Dopo 5-6 ore, quando la colorazione azzurrognola del complesso CH_2O-Fucsina si è completamente sviluppata, si esegue il confronto colorimetrico.

Per la valutazione il metodo suggerisce di usare, *benchè non siano indispensabili, i comuni colorimetri.* La determinazione dell'alcole metilico, secondo il metodo ufficiale, può essere fatta *confrontando la colorazione ottenuta con quelle che nelle stesse condizioni, danno soluzioni a noto contenuto, o « soluzioni tipo »*. E' chiaro quindi che il metodo ufficiale ammette un sistema di valutazione visiva sulla cui validità e limiti si tornerà in seguito.

Reattivo di Schiff: si solubilizza 1 g di Fucsina (cristallizzata purissima, non solfonata) in ml 20 di HCl (1:2) in un pallone da 1 L e si porta a volume con H_2O. A parte si sciolgono 4 g di bisolfito di sodio in ml 20 di H_2O e si aggiunge tale soluzione a quella di Fucsina, agitando. Si lascia in riposo al buio in recipiente ben chiuso, fino a che non sia avvenuta la decolorazione completa.

A questo punto si deve notare però che tale « decolorazione completa » non avviene proprio; al più la soluzione di Fucsina passa da un colore rosa a un colore giallo chiaro. Qualche autore consiglia di decolorare il reattivo di Schiff con la quantità minima di carbone (9); con ciò si migliora senz'altro la valutazione visiva delle soluzioni da analizzare nel confronto con le soluzioni tipo. In pratica abbiamo riscontrato una esaltazione del colore e quindi una maggiore reattività della Fucsina così decolorata. Dello stesso avviso è lo Snell (10) che, per la preparazione del reattivo di Schiff, prescrive la decolorazione della soluzione di Fucsina solforosa con carbone attivato e un riposo di 2 giorni dopo il trattamento. La soluzione secondo quell'autore deve essere incolore al momento dell'uso.

Il metodo ufficiale, contrariamente a quello di Tavernier e Ja-Jacquin, non prescrive di sciogliere a caldo la Fucsina. Si è potuto constatare però che la soluzione di questo sale è molto lenta a freddo e non di rado, specie quando non si è agitato molto bene il reattivo per più giorni, si hanno inconvenienti sulla stabilità delle curve campione.

Risultati e discussioni

Nella tabella 1 allegata sono riportati i valori del metanolo in mg/L ottenuti con il metodo « acido cromotropico », con quello Tavernier-Jacquin e con quello ufficiale.

Per i due primi metodi si è seguito rigorosamente il procedimento relativo, per il metodo ufficiale si è adottato il tempo di 4' e la termostatazione dei campioni a 20° C, come è stato fatto in un nostro precedente lavoro (1). Per ogni serie di 6 vini si è ripetuta ogni volta la curva campione con dieci punti (o soluzioni tipo). Con ciò si è cercato di spingere al massimo la precisione delle misure, anche se in definitiva il procedimento è risultato piuttosto laborioso.

Tabella 1

	Metodo Acido cromo-tropico	Metodo Tavernier Jacquin	Metodo Ufficiale 4' tempo di ossidazione	
1	150	154	152	Merlot Prepotto
2	139	141	153	Merlot Spessa
3	122	115	141	Tocai Albana
4	137	138	139	Tocai Spessa
5	120	118	130	Merlot Spessa
6	77	78	95	Tocai Prepotto
7	144	149	161	Merlot Spessa

	Metodo Acido cromo-tropico	Metodo Tavernier Jacquin	Metodo Ufficiale 4' tempo di ossidazione	
8	146	146	147	Merlot Pradamano
9	207	209	208	Merlot Pradamano II torchio
10	128	131	144	Cabernet Pradamano
11	82	85	58	Verduzzo Pradamano
12	99	101	119	Tocai Pradamano
13	47	52	68	Pinot grigio Pradamano
14	153	159	153	Merlot Spessa
15	139	132	130	Cabernet Spessa
16	123	120	139	Merlot Albana
17	72	80	91	Verduzzo Albana
18	112	108	115	Tocai Spessa
19	94	94	87	Tocai Ipplis
20	73	72	62	Tocai Faedis
21	32	35	26	Verduzzo Faedis
22	77	78	70	Tocai Moimacco
23	144	145	139	Merlot Moimacco
24	333	349	338	Rosso veloce-pressa (Merlot - Lambrusco - Refosco) Rauscedo
25	96	97	84	Lambrusco-Refosco Rauscedo
26	106	107	127	Tocai Rauscedo
27	145	142	159	Merlot Rauscedo
28	118	112	109	Ancellotta Rauscedo
29	76	80	64	Tocai Casarsa
30	119	113	108	Merlot Casarsa
31	50	54	71	Pinot Casarsa
32	133	138	121	Merlot Casarsa
33	133	140	120	Cabernet Casarsa
34	88	91	73	Pinot bianco Buttrio
35	73	71	86	Verduzzo Buttrio
36	89	85	101	Tocai Buttrio
37	97	94	119	Tocai Buttrio
38	103	103	89	Cabernet Buttrio
39	155	151	165	Merlot Buttrio
40	90	90	83	Tocai Buttrio
41	65	68	43	Verduzzo Buttrio
42	193	190	211	Merlot Buttrio
43	149	150	163	Cabernet Buttrio
44	89	87	85	Tocai Casarsa
45	151	159	159	Merlot S. Vito
46	111	117	110	Merlot S. Vito
47	131	136	140	Merlot S. Vito
48	106	108	112	Cabernet Casarsa
49	242	242	236	Uve miste torchiato
50	72	69	65	Verduzzo Caminetto di Buttrio
51	86	89	102	Tocai Buttrio
52	91	86	112	Malvasia Buttrio
53	90	92	110	Tocai Vicinale di Buttrio

	Metodo Acido cromo-tropico	Metodo Tavernier Jacquin	Metodo Ufficiale 4' tempo di ossidazione	
54	139	140	164	Merlot Oleis
55	112	108	120	Malvasia Ipplis
56	147	149	143	Merlot Ipplis
57	172	175	182	Merlot Manzano
58	67	66	80	Verduzzo Percoto
59	165	157	158	Merlot Percoto
60	149	151	142	Merlot Percoto
61	61	60	51	Pinot grigio Buttrio
62	109	114	106	Tocai Buttrio
63	113	109	108	Cabernet Buttrio
64	110	108	105	Merlot Buttrio
65	308	314	332	Torchiato bianco Bertiolo
66	305	304	337	Torchiato rosso Bertiolo
67	175	180	153	Nostrano Bertiolo
68	195	190	205	Merlot Bertiolo
69	176	173	178	Merlot Bertiolo
70	147	138	201	Tocai Bertiolo
71	125	118	102	Tocai Bertiolo
72	116	120	98	Tocai Bertiolo
73	104	104	96	Tocai Bertiolo
74	104	106	111	Tocai Bertiolo
75	112	110	95	Pinot bianco Bertiolo
76	98	100	150	Pinot grigio Bertiolo
77	142	140	154	Cabernet Cervignano
78	209	207	215	Merlot Cervignano
79	81	84	76	Riesling Cervignano
80	80	92	84	Pinot bianco Cervignano
81	75	81	65	Tocai Cervignano
82	60	56	64	Verduzzo Cervignano
83	163	165	185	Nostrano Buttrio
84	124	130	128	Merlot Buttrio
85	327	340	319	Merlot nostrano Buttrio torchiato
86	114	128	128	Cabernet Pozzuolo
87	101	100	95	Verduzzo Pozzuolo
88	159	158	163	Merlot Pozzuolo
89	123	120	123	Pinot rosso Pozzuolo
90	107	112	118	Marzemino Pozzuolo
91	157	153	161	Tocai Pozzuolo
92	311	325	309	Rosso misto Ramuscello (veloce-pressa)
93	112	118	107	Rosso comune Ramuscello
94	129	128	116	Tocai Ramuscello
95	101	96	85	Verduzzo Ramuscello
96	145	145	149	Cabernet Porcia
97	140	146	131	Merlot Porcia
98	78	71	60	Pinot bianco Porcia
99	159	162	177	Rosso misto Porcia (vinificato in vinificatore)
100	98	103	98	Merlot Porcia

	Metodo Acido cromo-tropico	Metodo Tavernier Jacquin	Metodo Ufficiale 4' tempo di ossidazione	
101	95	97	89	Merlot Porcia
102	114	113	107	Merlot Porcia
103	73	72	60	Verduzzo di Ramandolo
104	110	105	105	Rosso Nimis
105	97	98	96	Rosso Nimis
106	110	105	128	Rosso Nimis
107	106	100	110	Rosso Nimis
108	132	129	123	Rosso Nimis
109	128	128	124	Rosso Nimis
110	157	156	153	Rosso Nimis
111	131	136	138	Rosso Nimis
112	128	131	127	Rosso Nimis
113	123	127	132	Rosso Nimis
114	55	57	55	Verduzzo di Ramandolo
115	107	112	111	Rosso Nimis
116	142	145	170	Rosso Nimis
117	126	126	129	Rosso Nimis
118	104	108	107	Rosso Nimis
119	136	141	133	Rosso Nimis
120	124	132	118	Rosso Nimis
121	315	309	277	Sopratorchiato S. Giorgio della Rinchin.
122	300	291	297	Sopratorchiato S. Giorgio della Rinchin.
123	366	365	382	Sopratorchiato S. Giorgio della Rinchin.
124	398	387	396	Sopratorchiato S. Giorgio della Rinchin.

Le soluzioni campione erano preparate partendo dalla « soluzione madre » di metanolo (la soluzione A dei metodi ufficiali) con una quantità pesata di CH_3OH assoluto [1]) depurato secondo Vogel (11).

Le densità ottiche di ogni singolo campione erano lette in un diagramma in cui si riportavano le estinzioni delle « soluzioni tipo » in ascissa, ed i corrispondenti valori del metanolo, in mg/100 ml di etanolo, in ordinata. Quest'ultimo valore, moltiplicato per il grado alcolico, dava il valore in mg/L direttamente comparabile con i dati del metodo Tavernier-Jacquin e acido cromotropico.

Nell'analisi dei 124 campioni della vendemmia 1966 ci si era prefissi uno scopo ben definito, cioè di stimare su un gran numero

---

[1]) L'alcole metilico puro per analisi contiene da 0.5 a 1% di H_2O e 0.1% di acetone. La depurazione consiste nel trattamento del metanolo con magnesio attivato con jodio ed è dovuta essenzialmente al magnesio-metilato, che si forma ed assorbe l'acqua presente.

Una successiva distillazione frazionata porta ad un alcole metilico purissimo, la cui d_{20}^{20} è 0.7924 ed il cui n_D^{20} è 1.3292.

di vini la precisione dei tre metodi di valutazione del metanolo. Ogni dato che figura nella tabella 1 è in realtà la media di più determinazioni ripetute con operatori diversi, onde saggiare per ogni metodo quanto grandi erano le differenze che si potevano riscontrare nelle successive ripetizioni.

Si è constatato nel corso del lavoro, che gli scostamenti minori si sono verificati per il metodo acido cromotropico, che quasi uguali erano quelli del metodo Tavernier-Jacquin, mentre sensibilmente maggiori erano le differenze che si ottenevano, per un pari numero di ripetizioni, nell'analisi eseguita con il metodo ufficiale con 4' di ossidazione. In particolare per i valori bassi, fino a circa 70 mg/L e per i valori alti, al di sopra di 200 mg/L, le differenze tra i termini estremi delle ripetizioni, per ogni singolo campione analizzato con il metodo ufficiale, erano notevoli. Questo fatto è spiegabile con l'andamento del primo tratto della curva campione della Fucsina per i valori bassi e con l'irregolarità del rendimento di ossidazione dell'alcole metilico ad aldeide formica, per i valori elevati del rapporto $\frac{\text{metanolo}}{\text{etanolo}}$

Nel confronto dei tre metodi si è adottata la valutazione dell'alcole metilico in mg/L, analogamente a quanto è stato fatto da qualche autore italiano (12-13), e secondo la proposta del Mascolo (14).

Del resto in Francia ed in altri paesi il metanolo è da sempre espresso in mg/L per le bevande alcoliche, per i sidri e per i succhi di frutta (4-15-16-17-18). Negli Stati Uniti l'alcole metilico viene dato in parti per 100 per gli alcolici (19), valutazione da cui si risale facilmente al valore in mg/L, senza dover usare la formula di trasformazione [1]) necessaria per passare dal riferimento adottato in Italia a quello in mg/L.

Nel prospetto 1 si riporta per ogni metodo la media, lo scarto tipo o deviazione standard e l'errore standard dei 124 dati ottenuti.

---

[1]) Per risalire dal valore in alcole metilico espresso in ml/100 ml di alcole etilico a quello in mg/L della terminologia francese, si può far uso della seguente formula:

$$\mathbf{M}\,(\text{mg/L}) = m\,\frac{\mathbf{A}}{10} \cdot 0.7924 \cdot 10^3$$

dove m = ml/100 ml di alcole etilico

$m\,\frac{\mathbf{A}}{10}$ = ml/L di vino

$0.7924 = d\,{}^{20}_{20}$ dell'alcole metilico.

A = grado alcolico.

PROSPETTO 1

Metodi	Acido cromotropico	Tavernier-Jacquin	Fucsina Metodo ufficiale con tempo di ossidazione 4'
Media	132.95	133.36	135.37
Deviazione standard	± 65.67	± 65.95	± 67.94
Errore standard	± 5.90	± 5.92	± 6.10

Dall'esame delle medie e delle deviazioni standard, si nota come le determinazioni, ottenute con il metodo acido cromotropico, siano molto prossime a quelle « Tavernier-Jacquin ». La corrispondenza con il metodo ufficiale 4' di ossidazione è lievemente inferiore, ma si può ancora definire buona.

Al fine di stabilire la concordanza dei tre metodi, nelle determinazioni dello stesso lotto dei 124 campioni, si è applicata l'analisi della varianza con doppio criterio di classificazione (20-21).

PROSPETTO 2

Fonti di di variabilità	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Rapporti di F
Generale	371	1 633 644.0	—	$F_1 = \frac{13\,128.3}{75.108} = 174.8$
Tra campioni	123	1 614 784.4	13 128.3	$F_2 = \frac{191.5}{75.108} = 2.550$
Tra metodi	2	383.0	191.5	
Errore	246	18 476.6	75.108	

Valori tabulari di F_1 per 123 e 246 gradi di libertà $P_{0.05} = 1.30$
Valori tabulari di F_1 per 123 e 246 gradi di libertà $P_{0.01} = 1.45$
Valori tabulari di F_2 per 2 e 246 gradi di libertà $P_{0.05} = 3.04$
Valori tabulari di F_2 per 2 e 246 gradi di libertà $P_{0.01} = 4.70$

In base all'analisi della varianza del prospetto 2 si può affermare che, mentre tra i 124 campioni esistono differenze altamente significative (F calcolato $\gg$ F tabulare), non ci sono differenze significative tra i metodi (F calcolato $<$ F tabulare). Si può concludere quindi con un livello di probabilità dello 0.01, cioè con una probabilità su 100 di essere in errore, che i tre metodi concordano.

La stessa analisi della varianza applicata al metodo acido cromotropico e Tavernier-Jacquin, porta alla medesima conclusione come appare dal prospetto 3.

PROSPETTO 3

Fonti di variabilità	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Rapporti di F
Generale	247	1 065 590.71	—	$F_1 = \frac{8650.56}{12.527} = 690.5$
Tra campioni	123	1 064 018.71	8 650.56	$F_2 = \frac{31.22}{12.527} = 2.49$
Tra metodi	1	31.22	31.22	
Errore	123	1 540.78	12.527	

Valori tabulari di F_1 per 123 e 123 gradi di libertà $P_{0.05}$ 1.36
Valori tabulari di F_1 per 123 e 123 gradi di libertà $P_{0.01}$ 1.55
Valori tabulari di F_2 per 1 e 123 gradi di libertà $P_{0.05}$ 3.92
Valori tabulari di F_2 per 1 e 123 gradi di libertà $P_{0.01}$ 6.84

L'impiego del t di Student ha confermato le deduzioni stabilite con l'analisi della varianza.

Nel confronto: metodo acido cromotropico - metodo Tavernier, si può dunque rigorosamente affermare, in base al rapporto $\frac{\text{varianza tra metodi}}{\text{varianza dell'errore}}$, che tra i due procedimenti non esistono differenze significative con una probabilità di essere in errore inferiore a 1 volta su 100.

Una volta stabilito che tra i metodi, col rigore e con i criteri limitanti con cui è stato applicato il metodo ufficiale, non esistono differenze significative o che in altre parole vi è un'alta corrispondenza è opportuno fare alcune considerazioni sul metanolo in Friuli nella vendemmia 1966.

Riprendendo in esame i valori dell'alcole metilico della tabella 1, ottenuti con il metodo acido cromotropico per l'intero lotto dei 124 campioni, si sono calcolati i valori medî, gli scarti tipo, gli errori standard, i massimi e i minimi riportati nel prospetto 4.

PROSPETTO 4

	Valori medi del metanolo in mg/L	Deviazione standard	Errore standard	Valore massimo	Valore minimo
Vini Bianchi 48	90.39	± 25.61	± 3.70	157	32
Vini Rossi 64	133.22	± 23.35	± 2.92	193	95

Se si confrontano le medie del prospetto 4 con le medie ottenute nella vendemmia 1965 (1), 88 mg/L per i vini bianchi e 140 mg/L per i vini rossi, si può constatare che grandi differenze non si sono avute da un anno all'altro. Si consideri che le zone erano le medesime dell'annata precedente, e cioè a grandi linee complesso eocenico orientale e zone di pianura. La vendemmia 1966, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, è stata migliore della precedente.

Le medie riportate nel prospetto 4 si riferiscono in realtà a 112 campioni di vino dell'intero lotto dei 124, cioè a vini fiore e a vini ottenuti con le tradizionali tecniche. Sono stati esclusi i 12 campioni di vino che, stando alla determinazione del Vitagliano (22), possono definirsi di supertorchiatura. Dai vini fiore è stato escluso il numero 78 perchè, pur essendo dichiarato Merlot comune, si sono avuti buoni motivi per giudicarlo un taglio con sopratorchiato.

Come si può notare dalle deviazioni standard del prospetto 4, il campionamento del 1966 rivela nei riguardi del metilico, uno scostamento dalle medie inferiore a quello del 1965 (± 38 per i bianchi e ± 36 per i rossi nel 1965).

Anche per l'annata 1966 si può concludere, come già per il 1965, che i vini ottenuti con le tecniche tradizionali sono entro i limiti proposti dal D.P.R. 12 Febbraio 1965. Certo che, se nelle statistiche si vuole includere i vini ottenuti con il taglio con torchiati o addirittura i sopratorchiati, le conclusioni cambiano totalmente.

Quanto ai limiti del decreto governativo che come si sa, sono 0.20 per i vini bianchi 0.25 ml/100 ml di alcole etilico per i vini rossi, se si esprimono i risultati dell'alcole metilico in mg/L, in base alla formula di trasformazione già riportata (3), (ammesso di avere un vino con il 10% di gradazione alcolica) i valori massimi consentiti diventano 158.3 e 197.9 mg/L rispettivamente.

Se si arriverà, come è auspicabile, a uniformare il metodo di determinazione del metanolo e ad accettare l'espressione in mg/L del suo valore, si dovrà però, alla luce delle considerazioni fatte, della tossicità di quest'alcole, dell'evolversi delle tecniche di vinificazione, rivedere anche i valori consentiti nei vini. Come già si è osservato (3), trasformando i limiti dello 0.20 e 0.25 del decreto nei corrispondenti valori in mg/L, i vini più alcolici (con un contenuto maggiore di

10°) ne verrebbero a perdere nei confronti dei vini a un tenore inferiore di alcole.

Ricorrendo ad un esempio pratico, un vino di 14° che contenga 0.20 ml di alcole metilico per 100 ml di alcole etilico, quindi regolare, verrebbe ad avere 221 mg/L di metanolo contro i 158.3 mg/L di un vino di 10°.

C'è infine un'ultima considerazione non meno importante, e cioè la precisione dei metodi adottati per controllare tali limiti.

Se si confrontano infatti i contenuti in metanolo massimi del prospetto 4, con i limiti 158.3 e 197.9 mg/L per i vini bianchi e rossi rispettivamente, si comprende come un qualsiasi metodo di determinazione dell'alcole metilico deve avere una precisione ben elevata, non certo quella del metodo ufficiale che non è stata neppure definita finora, per non portare ad una conclusione assurda cioè definire irregolare un vino sicuramente genuino.

Considerazioni sui metodi

Come si è accennato il metodo ufficiale è stato applicato nell'analisi dei 124 campioni di tabella 1 con alcuni criteri particolari, onde rendere maggiore la precisione.

Il tempo di ossidazione è stato aumentato a 4' al fine di diminuire il rapporto « tempo di miscelazione del $KMnO_4$: tempo di ossidazione » e avere quindi una maggiore possibilità di standardizzare il periodo di reazione.

Ogni serie di 6 campioni è stata analizzata unitamente alle soluzioni tipo ed infine le prove erano termostatate a 20° C, il che non è prescritto dal metodo ufficiale.

Nonostante tutte queste precauzioni, un certo numero di dati rivelava degli scostamenti troppo elevati dal valore medio di ogni singolo campione e dai corrispondenti valori ottenuti con gli altri metodi, e doveva essere scartato.

Durante il corso delle analisi si è avuto modo di notare che il numero di dati anomali, pur cambiando operatore, non diminuiva, anche se nel complesso il tempo di ossidazione di 4' rivelava una precisione più elevata che non quello di 2'.

In definitiva il fatto che gli scostamenti dalla media del metodo ufficiale erano più elevati, mentre le differenze dei valori ripetuti con il metodo Tavernier e acido cromotropico erano assai piccole, ci ha portato al convincimento che anche la precisione del metodo ufficiale con 4' di ossidazione doveva essere limitata.

Al fine di approfondire l'esame dei metodi si è voluto instaurare una ulteriore esperienza su una base diversa da quella adottata per i valori di tabella 1.

Il principio era di porsi nelle condizioni più vicine possibili a quelle pratiche di un laboratorio, che debba eseguire un gran numero di analisi con una data tecnica, di cui sia data per certa la validità. Si sono scartate perciò le ripetizioni e si è voluto allargare l'analisi dei metodi includendo, oltre a quelli di tabella 1, il metodo ufficiale tal quale con 2' di ossidazione nelle due varianti: valutazione visiva e fotometrica.

Per effettuare questo confronto si è proceduto all'analisi di 21 campioni dal contenuto abbastanza vario di alcole metilico (da 65 a 326 mg/L), ed i dati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

TABELLA 2

N.	Acido cromotropico	Metodo ufficiale	Metodo ufficiale valutazione visiva	Metodo ufficiale t. ossidazione = 4'	Tavernier-Jacquin
1	197	178	170	195	197
2	65	40	55	53	55
3	125	126	105	148	120
4	122	102	82	121	115
5	122	96	115	113	125
6	144	112	117	116	144
7	163	137	150	137	156
8	190	191	190	197	190
9	155	131	133	136	160
10	326	300	182	285	313
11	104	76	100	79	96
12	307	276	195	278	311
13	92	63	52	63	94
14	101	81	54	107	97
15	190	146	155	140	192
16	165	142	126	144	171
17	170	147	148	139	183
18	146	133	145	141	141
19	166	140	134	151	156
20	102	87	102	97	102
21	85	60	54	73	89

Praticamente si è applicato il metodo « acido cromotropico », il « Tavernier-Jacquin », il metodo ufficiale « 2' di ossidazione », « 4' di ossidazione » e « valutazione visiva ».

Nel prospetto 5 si sono riportati per ogni metodo il valore medio, lo scarto tipo o deviazione standard, l'errore standard ed i limiti fiduciari della media.

PROSPETTO 5

Metodi		Acido cromotropico	Metodo ufficiale tempo di ossidazione 2'	Metodo ufficiale valutazione visiva	Metodo ufficiale tempo di ossidazione 4'	Metodo Tavernier-Jacquin
Media		154.14	131.62	122.09	138.71	152.71
Deviazione standard		±65.28	±64.79	±45.11	±60.35	±65.72
Errore standard		±14.25	±14.15	± 9.85	±13.18	±14.35
Limiti fiduciari	l_1	183.87	161.14	142.64	166.20	182.64
t 0.05 = 2.086	l_2	124.41	102.10	101.54	111.22	122.78

Come si può constatare a colpo d'occhio, dall'esame delle medie e dei limiti fiduciari, si nota una elevata concordanza tra il metodo acido cromotropico e quello Tavernier-Jacquin, mentre per le rimanenti tecniche la corrispondenza appare dubbia. Vi è da rilevare infine che se la valutazione visiva dà dei dati appena accettabili, direi indicativi fino a un contenuto massimo di 180-200 mg/L, pari a circa 0.20 ml/100 ml di alcole etilico, al di sopra di tali valori la comparazione visiva delle colorazioni ottenute con quelle standard, diviene impossibile.

L'analisi della varianza, applicata alla tabella 2 secondo i criteri già citati per la tabella 1 (20-21), conferma infatti che tra i metodi nel loro insieme esistono differenze significative; ciò appare dal prospetto 6.

PROSPETTO 6

Fonti di variabilità	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Rapporti di F
Generale	104	385 369	—	$F_1 = \frac{17\,334.1}{285.65} = 60.68$
Tra campioni	20	346 682	17 334.10	
Tra metodi	4	15 835	3 958.75	$F_2 = \frac{3958.75}{285.65} = 13.86$
Errore	80	22 852	285.65	

Valori tabulari di F_1 per 20 e 80 gradi di libertà $P_{0.05}$: 1.70
Valori tabulari di F_1 per 20 e 80 gradi di libertà $P_{0.01}$: 2.11
Valori tabulari di F_2 per 4 e 80 gradi di libertà $P_{0.05}$: 2.48
Valori tabulari di F_2 per 4 e 80 gradi di libertà $P_{0.01}$: 3.56

D'altro canto l'impiego del t di Student per confronti a coppie, in tutte le possibili combinazioni tra metodi, ha messo in chiaro che soltanto tra il metodo acido cromotropico e Tavernier-Jacquin non esistono differenze significative.

Ciò appare evidente anche dall'impiego dell'analisi della varianza con due criteri di classificazione del prospetto 7.

PROSPETTO 7

Fonti di variabilità	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Rapporti di F
Generale	41	172 038.3	—	$F_1 = \frac{8580}{20.83} = 411.9$
Tra campioni	20	171 600.3	8580	
Tra metodi	1	21.4	21.4	$F_2 = \frac{21.4}{20.83} = 1.027$
Errore	20	416.6	20.83	

Valori tabulari di F_1 per 20 e 20 gradi di libertà $P_{0.05}$ 2.12
Valori tabulari di F_1 per 20 e 20 gradi di libertà $P_{0.01}$ 2.94
Valori tabulari di F_2 per 1 e 20 gradi di libertà $P_{0.05}$ 4.35
Valori tabulari di F_2 per 1 e 20 gradi di libertà $P_{0.01}$ 8.10

Nel prospetto 7 il confronto tra il metodo acido cromotropico e il metodo Tavernier-Jacquin, porta a una conclusione altamente probabile, che tra i due metodi non esistono differenze significative.

Per brevità non si riportano tutti gli altri confronti eseguiti. E' opportuno però soffermarci su un'ultima considerazione. Già nei precedenti lavori si era sottolineata la necessità di ripetere i dati ottenuti con il metodo ufficiale (4' di ossidazione) e di confrontarli con i valori del metodo acido cromotropico e Tavernier-Jacquin.

Era implicito quindi il dubbio che anche il tempo di ossidazione di 4', pur migliore di quello di 2' per accuratezza e precisione, non fosse completamente sicuro. Ciò appare evidente dall'esame delle medie e degli scarti tipo del prospetto 5 e dall'analisi della varianza applicata ai tre metodi del prospetto 8, nell'ordine: acido cromotropico, metodo ufficiale « 4' di ossidazione » e Tavernier-Jacquin.

PROSPETTO 8

Fonti di variabilità	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Rapporti di F
Generale	62	247 918	—	$F_1 = \frac{12\,004.2}{119.525} = 100.432$
Tra campioni	20	240 084	12 004.2	
Tra metodi	2	3 053	1526.5	$F_2 = \frac{1526.5}{119.525} = 12.771$
Errore	40	4 781	119.525	

Valori tabulari di F_1 per 20 e 40 gradi di libertà $P_{0.05}$: 1.84
Valori tabulari di F_1 per 20 e 40 gradi di libertà $P_{0.01}$: 2.37
Valori tabulari di F_2 per 2 e 40 gradi di libertà $P_{0.05}$: 3.23
Valori tabulari di F_2 per 2 e 40 gradi di libertà $P_{0.01}$: 5.18

E' chiaro che si deve concludere che tra il metodo ufficiale nelle sue varianti da una parte e il metodo acido cromotropico-Tavernier dall'altra, esistono differenze altamente significative, cioè con una probabilità di essere in errore inferiore all'1%. L'analisi della varianza, applicata al metodo acido cromotropico e Tavernier Jacquin verso il metodo ufficiale 4' di ossidazione, riconferma tale conclusione.

Si può concludere che anche il metodo ufficiale, con un tempo di ossidazione di 4', può portare dunque per piccole serie di valori e senza usare l'artificio del controllo di ogni singolo dato con le ripetizioni, a risultati errati. Anche la sua precisione è dunque limitata se non si adottano particolari attenzioni.

Fabbri e Corradini (23) hanno proposto di modificare il metodo ufficiale aumentando il tempo di ossidazione a 20', con il che affermano di ottenere una effettiva riproducibilità della misura.

Resta a vedere quanto una tale tecnica, congiunta a tutte le varianti, cioè ossidazione in ambiente acido per acido fosforico e lettura a 568 mμ, differisca dal metodo Tavernier-Jacquin, che ha il vantaggio di essere abbastanza veloce (lettura dopo 1 ora e ½, due ore) e di lavorare in scala più piccola.

Dall'esame dei dati di tabella 2 e dalle successive considerazioni, si può concludere in definitiva che il metodo acido cromotropico nella tecnica da noi elaborata e quello Tavernier-Jacquin, si equivalgono nei riguardi della precisione.

A suo vantaggio il metodo che impiega come reagente l'acido 1.8-diidrossi-naftalen-3,6-disolfonico ha una tecnica assai semplice e minor numero di reattivi, una relazione lineare tra la densità ottica

delle soluzioni e la quantità di CH_3OH, mentre a vantaggio del metodo Tavernier-Jacquin gioca il tempo minore di sviluppo del colore e il minor pericolo di inquinamento, data la più bassa sensibilità del reattivo di Schiff rispetto all'acido cromotropico.

Riassunto

Sono stati analizzati 124 campioni della vendemmia 1966 in Friuli; se ne è determinato il contenuto in alcole metilico che è risultato mg 90.4 ± 3.7 per i vini bianchi, 133.2 ± 2.9 per i rossi.

L'esame dei campioni è stato eseguito con tre metodi: quello ufficiale italiano, il « Tavernier-Jacquin » e quello che impiega come reagente l'acido cromotropico (3).

Una serie di osservazioni fatte durante l'esperienza, ci ha portato ad una analisi critica approfondita sulla validità dei metodi, vale a dire ad una stima della loro precisione.

Mentre da un lato le tecniche di determinazione: « acido cromotropico », « Tavernier-Jacquin » concordano alla luce dell'analisi statistica, il metodo ufficiale italiano ha rivelato una scarsa precisione (± 34 mg/L) e una notevole discordanza.

Se il tempo di ossidazione viene aumentato a 4', la tecnica ufficiale risulta migliore ma sempre con una precisione limitata. In definitiva, avendo accertato che i più alti valori dell'alcole metilico nei vini, sono assai prossimi ai limiti ammessi dalla legge, si può concludere che soltanto i metodi « acido cromotropico » e « Tavernier-Jacquin » hanno una precisione tale da stabilire, con una tolleranza di errore minima, se un vino è realmente entro o fuori i massimi consentiti.

Summary

The methanol content was determined of 124 samples of wines collected in 1966.

The average values were 90.4 ± 3.7 for white wines, 133.2 ± 2.9 for red wines. Each of the samples was analysed with three different methods: by italian official method (4' oxidation time), by Tavernier-Jacquin, and according a new technique using chromotropic acid as reagent for methanol (3).

Statistical comparison of the procedures showed a favourable agreement with some reservations for the official method.

A further study of the precision gave these results: a very low precision of the official method with two minutes of oxidation time

(± 34 mg) and a high disagreement in comparison with chromotropic and Tavernier's methods.

An oxidation time of four minutes gave better results, but still no agreement (when the analysis are not replicated) with the two tecniques mentioned above, that is Tavernier's and chromotropic.

The statistical analysis of the last procedures, Tavernier compared with chromotropic acid, showed a high degree of agreement.

L'autore desidera ringraziare la signorina De Ros A. per. chim. e il signor Foschiani L. per la valida collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

1 GIGLIOTTI A. - Il contenuto in metanolo dei vini friulani della vendemmia del 1965. *Nuovi studi della Stazione di Chimico-Agraria Sperimentale di Udine,* N. 97, 1968.

2 Metodi Ufficiali d'analisi, I Ristampa, Min. Agr. e For., Istituto Poligrafico dello Stato, Roma, 1958.

3 GIGLIOTTI A. - La determinazione del metanolo nei vini con l'acido 1,8-diidrossinaftalen-3,6-disolfonico. *Nuovi studi della Stazione Chimico-Agraria Sperimentale di Udine,* N. 99, 1968.

4 JACQUIN P., TAVERNIER J. - Microdosage colorimétrique du méthanol. Application de la méthode aux cidres et aux eaux de vie de cidre. *Ann. Technol. Agric.,* 2, 113-136, 1953.

5 BERTRAND G., SILBERSTEIN L. - *Méthode améliorée de recherche et de dosage* de petites quantités de méthanol. *Annales Inst. Pasteur,* 174, I, p. 234-241, 1948.

6 BOUZIGUES M.me L. - Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Annales de Technologie agricole,* N. 2, p. 223, 1955.

7 MATHERS A. P. - *Journal Assoc. Official Agr. Chemists,* 38, 753-6, 1955.

8 YAMAMURA S., MATSUOKA T. - Colorimetric determination of methanol in ethanolic solutions with chromotropic acid. (Kyoto city Ind. Res. Lab.) *Journal Society Brewing Japan* 49, III-5, 1954.

9 VETTORI M. Dosaggio dell'alcole metilico. Laboratorio statale di Chimica Agraria di Conegliano. 1965.

10 SNELL F. D., SNELL C. T. - Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Company Inc., New York 1953, III Edition, Vol. III, p. 45.

11 VOGEL A. - Elementary practical organic chemistry. 5th impression, Longmans Green & Co. Ltd., 1965, 147-148, II, 36.

12 TOLU LIBERO A. - La determinazione dell'alcole metilico nei vini. *Rivista di Viticoltura ed Enologia,* N. 12, 425, 1962.

13 COLAGRANDE O. - Sulla determinazione colorimetrica del metanolo nei vini. *Annali della Facoltà di Agraria,* Vol. LXXIX, fasc. III, 172, Dic. 1960.

14 MASCOLO *A.* - Osservazioni sul metodo ufficiale di analisi per la determinazione dell'alcole metilico nei vini e nei mosti. *Rivista di Viticoltura ed Enologia,* N. 6, 215, 1966.

15 RIBÉREAU-GAYON J.-PEYNAUD E. - Analyse et contrôle des vins, deuxième édition, Librairie Polytechnique ch. Béranger, Paris 15, Rue des Saints-Pères, 1958, 262 e seg., XII.

16 FLANZY M. - L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. *Thèse Imp. Régionale,* Toulouse, 1934.

17 GUIMARÃES A. F. - O àlcool metílico no vinho do Porto e notras bebidas alcoólicas. *De Vinea et Vino Portugaliae Documenta,* Vol. 2, Dez. 1965

18 BOUSCHARAIN H., BOIVIN R. - Présence du méthanol dans les jus de fruits et dans les nectars. *Annales des Fals. et de l'Expert. chim.,* N. 676, 188-192, 1967.

19 Methods of analysis of the Assoc. of official Agric. Chemists, 9th Ed., Assoc. af Agric. Chemists, Washington 4 D.C., 109, 1960.

20 YOUDEN W. I. - Statistical methods for Chemists. John Wiley & Sons Inc., New York, chapter 6, 1951.

21 SCOSSIROLI R. E. - Manuale di Statistica per ricercatori. Ing. Olivetti, Ivrea, cap. 34-39, 1962.

22 VITAGLIANO M., IDINI G. - Indagini sulla composizione dei vini di supertorchiatura di provenienza sarda. *Rivista di Vitic. ed Enol.* N. 12, p. 440, 1962.

23 FABBRI G., CORRADINI C. - Alcune osservazioni sulla determinazione dell'alcole metilico nel vino. *Annali della Facoltà di Agraria del S. Cuore,* Anno VI, fascicolo I, p. 63-69, 1966.